

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh

KORRELATION ZWISCHEN SPEZIFISCHER
HORMONAUFNAHME IN DIE THYMUSZELLE UND
RNA-SYNTHESE WÄHREND DER RATTENENTWICKLUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von —

RAINER SCHMIEDEBERG

aus Marburg/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh

KORRELATION ZWISCHEN SPEZIFISCHER
HORMONAUFNAHME IN DIE THYMUSZELLE UND
RNA-SYNTHESE WÄHREND DER RATTENENTWICKLUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

RAINER SCHMIEDEBERG

aus Marburg/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 23.1.1976.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan Prof.Dr.H.Oepen

Referent Prof.Dr.F.Linneweh

Correferent Prof.Dr.K.Havemann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
- 2.1 Material
- 2.2 Gewinnung der Rohkerne
- 2.3 Reinigung der Zellkerne
- 2.4 Gewinnung des Thymuscytosols
- 2.5 Bestimmung der Bindungskapazität des Thymuscytosols für ^3H -Dexamethason
- 2.6 Die Dextran-Tierkohle Technik
- 2.7 Untersuchung der RNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne
- 2.8 Untersuchung der RNA-Synthese nach in vivo-Gabe von Dexamethason an Ratten unterschiedlicher Entwicklungsstadien
- 2.9 DNA-Bestimmung nach Burton
- 2.10 Eiweißbestimmung nach Lowry
- 2.11 Elektronenoptische Untersuchung
- 2.12 Berechnung der Ergebnisse
3. Ergebnisse
- 3.1 Elektronenoptische Untersuchung
- 3.2 Zeitkinetik der ^3H -UTP Inkorporation durch isolierte Thymozytenkerne
- 3.3 RNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne während der Rattenentwicklung
- 3.4 Bindungskapazität von Thymuscytosol für ^3H -Dexamethason
- 3.5 Hemmbarkeit der RNA-Synthese durch Dexamethason
- 3.6 Zusammenfassende Darstellung von Thymusgewicht, spezifischer Dexamethasonbindungskapazität und RNA-Syntheseleistung im Verlauf der Rattenentwicklung
4. Diskussion
5. Zusammenfassung

1. Einleitung

Wachstum und Differenzierung im Verlauf der Entwicklung sind wesentlich durch die Transcription, d.h. die Umsetzung genetischer Information von DNA in RNA beeinflusst. Dieser Transcriptionsschritt wird unter anderem während der Individualentwicklung von Mammalien durch Peptid- und Glucocorticosteroidhormone gesteuert (17,20,21,26, 28,32,33,38,40,41,43,48). Ihre Wirkung ist abhängig von dem Vorhandensein spezifischer Bindungsproteine. Derartige Steroidhormonrezeptoren sind in den entsprechenden Erfolgsorganen nachweisbar und wurden in letzter Zeit in zahlreichen Geweben beschrieben (5,12,18,19,26,35,44), ihre Eigenschaften sind insbesondere für Östradiol bekannt (26): Im Zytoplasma östrogensensibler Organe befindet sich ein Protein, welches weitgehend rein dargestellt wurde. Es hat zur Funktion, das Hormon in der Zelle zu binden; hierdurch ist die Hormonkonzentration im Erfolgsorgan wesentlich näher als im umgebenden Gewebe oder im Blut. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, daß der Rezeptor-Hormonkomplex durch die Kernmembran in den Zellkern gelangt und somit neben seiner Discriminatorfunktion auch eine intrazelluläre Transportfunktion ausübt. Aus in vivo- und in vitro-Versuchen kann geschlossen werden, daß er an der Regulation der Transcription beteiligt ist.

Ob dies im Sinne einer positiven oder negativen Kontrolle erfolgt, ist noch umstritten. Unter der Wirkung des Rezeptor-Hormonkomplexes wird ein zu postulierender Repressor inaktiviert und somit das entsprechende Gen zur Transcription freigegeben; dieser Wirkungsmechanismus entspricht der oben erwähnten negativen Kontrolle. Oder der Hormon-Rezeptorkomplex verbindet sich - wie bei Bakteriensystemen bekannt - mit der Matritze (dem DNA/Proteinkomplex), wodurch die RNA-Polymeraseaktivität gesteigert und eine vermehrte Transcription resultieren würde. Hierfür wäre die Voraussetzung, daß der Rezeptor-Hormonkomplex an spezifische Genorte gebunden wird und

die dadurch bedingte Kontrolle der Transcription zu einem spezifischen, genetisch fixierten Hormoneffekt führt.

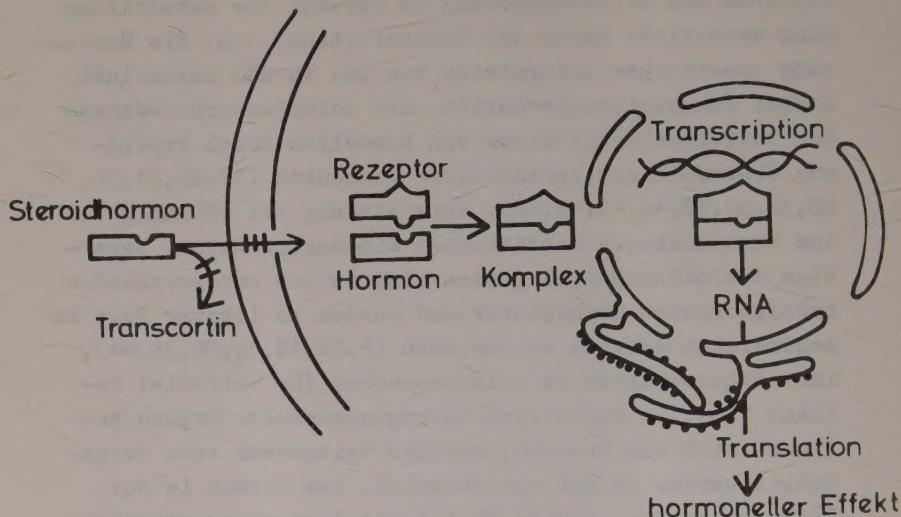


Abb. 1 Schematische Darstellung des Steroidhormonwirkungs-Mechanismen. Erläuterungen siehe oben.

welche der beiden Arbeitshypothesen zutrifft, ist noch nicht zu entscheiden; ganz offensichtlich ist die Kontrolle der Genregulation bei höheren Organismen wesentlich komplizierter als bei Bakterien. Für diese ist entsprechend dem Schema von Jakob und Monod (17) erwiesen, daß nach Induktion Messenger-RNA als Träger der in DNA gespeicherten genetischen Information in das Cytoplasma geschleust wird und dort als Matrize zur Synthese spezifischer Proteine dient. Um Mechanismen zur Regulation von Genaktivitäten aufzuklären, ist das hier aufgezeigte Modell der spezifischen Transcriptionsaktivierung, z.B. durch Hormone, überaus nützlich.

Für die Hormonwirkung über Genaktivierung finden sich erste Hinweise bei Clever und Karlson (11). Deren Experimente ergaben, daß das Insektenhormon Ecdyson an den

riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Chironomus tentans* Veränderungen hervorruft, die als Puffs bezeichnet werden. Dieses "Puffing-Phänomen" ist Ausdruck der Aktivierung bestimmter Genorte, denn es wurde festgestellt, daß Puffs Stellen reger RNA-Synthese sind. Analoge Wirkung anderer Steroidhormone auf den Grundmechanismus von Induktionsprozessen wurden für Mammalien in verschiedenen Organen beschrieben.

Während der Stoffwechsel der Leber durch Glucocorticoide vorwiegend anabol beeinflusst wird, kommt es in der Thymuszelle zu einer Hemmung zahlreicher Stoffwechselvorgänge. Bei der seit langem bekannten Thymusinvolution spielen neben den Sexualhormonen die Glucocorticosteroide eine entscheidende Rolle. Unter ihrem Einfluß kommt es zu einer vorwiegend katabolen Stoffwechselumstellung mit Veränderung der Protein- und Enzymsynthese (14,15,22,20), Akkumulation freier Fettsäuren (46), Hemmung der Glucoseaufnahme, Inhibierung der DNA- und RNA-Synthese, bis hin zur Karyolyse und Zytolyse (9,46,51). Der primäre Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide in der Thymuszelle (47) ähnelt dem in der Leberzelle (31,54). Wie oben dargelegt, bildet sich im Zytoplasma ein Hormon-Rezeptorkomplex, der nach Einschleusung in den Zellkern zu einer hormonspezifischen Veränderung der Transcriptionsrate führt. Einen wichtigen, meßbaren Parameter für intrazelluläre Hormonwirkung bildet die veränderte RNA-Syntheseleistung isolierter Zellkerne. Auf diese sind wahrscheinlich die oben genannten Umstellungen des Intrazellulärstoffwechsels zurückzuführen. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß dasselbe Hormon die RNA-Synthese je nach Erfolgsorgan unterschiedlich beeinflusst.

In der Leber kommt es zur Steigerung der RNA-Synthese. Die nach Hormongabe entstandene RNA ist in "in vitro Systeme" translatierbar und führt, entsprechend der Neusynthese spezieller m-RNA zur Induktion verschiedener Enzyme wie Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase (6,12,24,25,38,42,45).

Als weiteres Beispiel wird die Synthese der m-RNA für Glutaminsynthetase nach Corticoidgabe in der Retina gesteigert, hierbei ist der Translationsvorgang dieser m-RNA hormonunabhängig (32).

Wie oben bereits im Bezug auf spezifische Hormonbindungsproteine beschrieben, haben Sexualhormone in ihren Zielorganen ihren primären Wirkmechanismus in einer spezifischen Beeinflussung der RNA-Synthese. Androgene, welche Wachstum und Differenzierung bewirken, steigern die RNA-Synthese in Prostata und Vesicula seminalis (23,26,27,52), hemmen sie aber im Thymus. Östrogene stimulieren im Uterus die RNA- und Proteinsynthese, erhöhen die Matritzenaktivität des entsprechenden Chromatins, vermehren die Polyribosomenformation; ebenfalls in den Zellkernen des Ductus ovaricus steigern Östrogene die RNA-Synthese, insbesondere die einer in ein "in vitro System" übertragbaren m-RNA für Ovalbumin, einem spezifisch östrogenabhängigen Protein, das nach einer Induktionszeit von über 6 Tagen erscheint (3,13,16,18,19,33,34,44,50).

Auch Progesteron aktiviert die RNA-Syntheseleistung im ductus ovaricus induziert es die Bildung einer für Avidin spezifischen RNA (7,35,36,39), im Uterus steigert es die RNA-Synthese und stimuliert die Entstehung von Uteroglobulin. Die RNA-Syntheseleistung ist somit unmittelbar entsprechenden hormonellen Einflüssen unterworfen. Während in den oben beschriebenen und gut untersuchten Systemen die Hormonwirkung zumeist eine Stimulierung von RNA- und spezifischer Proteinsynthese zeigt, findet man im Gegensatz hierzu im Thymus eine Hemmung sowohl durch Sexualhormone als auch durch Glucocorticosteroide. Im Thymozyten besteht die biologische Wirkung dieser Hormone in einer deutlichen RNA-Synthesehemmung mit nachfolgender starker Verminderung einer Protein de novo Synthese. Ähnlich diesen hormonell induzierten Effekten kommt es auch im Verlauf der normalen Individualentwicklung zur Thymusinvolution.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die ^3H -Dexamethason-

bindungskapazität im Zytoplasma der Thymuszelle bestimmt und die gewonnenen Werte mit der mRNA-Syntheseleistung gereinigter Zellkerne korreliert. Darüberhinaus wurde versucht, eine Korrelation zwischen Bindungskapazität und hormoneller mRNA-Synthesehemmbarkeit der Thymozyten zu erstellen.

Es wurde das synthetische Glucocorticosteroid Dexamethason gewählt, da es eine außerordentlich starke biologische Wirksamkeit zeigt und - von besonderer Bedeutung - im Thymus nicht metabolisiert wird.

2. Material und Methodik

2.1 Material

Männliche Han-Wistar Ratten wurden vom Institut für Versuchstierzucht (Hannover) bezogen und unter Standardbedingungen gehalten. Erwachsene Tiere wurden erst 4 Tage nach Eintreffen für die Experimente herangezogen. Tiere unter 40 g entstammten einer eigenen Zucht; bei säugenden Tieren wurde auf gleiche Anlegezahl geachtet. Der Versuchsbeginn wurde jeweils konstant gehalten (9⁰⁰ Uhr). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um erstens Artefakten durch die zirkadianen Hormonschwankungen entgegenzuwirken und zweitens, um unterschiedliche Ernährungszustände mit sicherer Auswirkung auf den Intrazellulärstoffwechsel zu vermeiden.

Material	Bezugsquelle
³ H-Dexamethason 22 ci/ml	Radiochemical center Amersham
³ H-Uridin-5-Triphosphat 1 ci/ml	Radiochemical center Amersham
Dexamethason (unmarkiert)	Sigma Chemical Corporation St.Louis USA
Uridintriphosphat	Boehringer Mannheim
Guanosintriphosphat	Boehringer Mannheim
Cytidintriphosphat	Boehringer Mannheim
Adenosintriphosphat	Boehringer Mannheim
Folinreagens	Merck Darmstadt
Scintigel	Laborchemikalien und Labor- hilfsmittel Roth Karlsruhe
Tris (Tris-hydroxy- methylaminomethan)	Merck Darmstadt
POPOP (2,2-p-Phenyl- bis-phenyloxazol)	Merck Darmstadt
PPO (1-phenyloxazol)	Merck Darmstadt
alle übrigen Chemikalien	Merck Darmstadt

2.2 Gewinnung der Rohkerne

Die Versuchstiere wurden durch cervikale Dislokation getötet, die Thymi unmittelbar danach entnommen, von Blut und anhängendem Bindegewebe befreit und in eiskalten Puffer gebracht (TSS = 0,25 M Saccharose; 0,01 M $MgCl_2$; 0,05 M TRIS HCl pH 7,55). Nach Ermittlung des Organgewichtes wurde ca ein Gewichtsanteil Organ pro 10 Volumenteile Puffer mit der Schere vorzerkleinert und durch 8 Lagen Mull gepresst und die so gewonnene Zellsuspension in einer Christ-Kühlzentrifuge Zeta 17 10 min lang bei 800 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Thymuszellsediment in 7,5 ml hypotonem, eiskaltem Puffer (10 mM TRIS pH 7,9; 1,5 mM $MgCl_2$) in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Kühlung aufgearbeitet; hierbei betrug der Abstand der Teflonpistille zur Glaswand 0,2-0,25 mm. Die durch einen Elektromotor mit 1500 Upm betriebene Pistille wurde nach Erreichen des Homogenisatorbodens 15 mal auf und ab geführt. 5 min nach Aufnahme in hypotonem Puffer wurde das Homogenat durch Hinzufügen von 4-fach konzentriertem TSS in eine isotone Lösung überführt. Zur Trennung der Zellkerne vom Zytoplasma wurde erneut 10 min bei 800 x g zentrifugiert.

2.3 Reinigung der Zellkerne

Die nach 2.2 gewonnenen, unereinigten Kernsedimente wurden entsprechend der Methode nach Chauveau (10) in 10 ml hypertoner (2,2 M) Saccharoselösung in TSS suspendiert und homogenisiert. Diese homogene Suspension wurde auf 2 ml hypotoner Saccharoselösung aufgeschichtet und in einem SW 41 Rotor unter Verwendung einer L₂50 Beckmann Ultrazentrifuge 60 min bei 70 000 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren und sorgfältiger Reinigung der Wände des Zentrifugenröhrchens wurden die gereinigten, sedimentierten Zellkerne für die weiteren Untersuchungen verwandt.

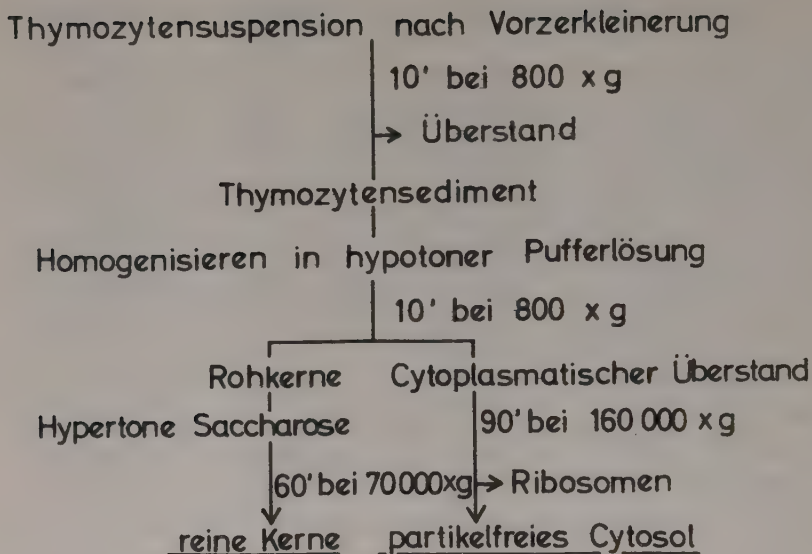


Abb. 2 Fraktionierung der Thymozytensuspension

2.4 Gewinnung des Thymuscytosols

Der bei 2.2 gewonnene Überstand wurde in einem 50 TI Festwinkelrotor nach beschriebener Methode 90 min bei 160 000 x g zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation sichtbare flotierende Lipoproteinschicht wurde vorsichtig abgesaugt und der partikelfreie zytoplasmatische Überstand für die Hormonbindungsuntersuchungen verwandt. einen Überblick über die Fraktionierung des Thymozytenhomogenates gibt die Abb.2.

2.5 Bestimmung der Bindungskapazität des Thymuscytosols für ^3H -Dexamethason

Das wie in 2.4 beschriebene, partikelfreie Thymuscytosol wurde 2 Stunden bei 4°C mit $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ^3H -Dexamethason inkubiert. Die spezifische Bindung wurde durch Parallelansätze mit einem 2 500-fachem Überschuß an nicht radio-

aktivem Dexamethason ermittelt. Mit Hilfe der Dextran-Tierkohle Technik wurde ungebundenes Steroidhormon entfernt.

2.6 Die Dextran-Tierkohle Technik (4)

Zur Eliminierung des überschüssigen, nicht gebundenen Dexamethasons wurde den nach 2.5 gewonnenen Testansätzen jeweils 100 μ l Dextran-Tierkohle zugesetzt (Zusammensetzung: 3,75 g Aktivkohle; 0,375 g Dextran 500 in 100 ml 10 mM TRIS HCl pH 8,0). Anschließend wurden die Proben mit einem Vortex-Mixer 10 min aufgeschüttelt und nach 10 min weitere 10 min lang bei 3 000 x g zentrifugiert. - Das beschriebene Vorgehen erfolgte bei 0°C. 200 μ l des Überstandes wurden zur Radioaktivitätszählung verwandt. Die Gesamtradioaktivität des Inkubationsgemisches wurde mit Blindproben, die anstatt Tierkohle 100 μ l TRIS enthielten, ermittelt. Die Differenz von an Cytosol-protein-gebundener Aktivität mit und ohne 2 500-fachem Überschuß nicht markierten Steroids wurde als Maß der spezifischen Hormonbindungskapazität gewählt.

2.7 Untersuchung der mRNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne

Die nach 2.3 gewonnenen Sedimente gereinigter Zellkerne wurden in 1 ml 67 mM TRIS pH 7,9 homogenisiert und zur Bestimmung der RNA-Polymeraseaktivität verwendet. Die Untersuchungen wurden in Triplikaten folgender Zusammensetzung durchgeführt: in einem Gesamtvolumen von 150 μ l waren jeweils 0,2 μ Mol ATP, CTP, GTP; 0,002 μ Mol UTP; 2 μ ci 3 H-UTP; 1,5 μ Mol Kreatinphosphat; 5 μ g Kreatinphosphokinase; 1,5 μ Mol Beta-Mercaptoäthanol; 10 μ Mol TRIS-HCl pH 7,9; 0,3 Mol $MgSO_4$; 100 μ l Kernsuspension, entsprechend ca. 5-7 μ g DNA/ml. Nach optimaler Synthesezeit (s.u.) wurde ein Aliquot von 100 μ l auf ca. 16 cm² große Filterplättchen pipettiert (Fa. Schleicher & Schuell 2043) und in 5% eiskalter TCA präzipitiert. Anschließend wurde 4 mal mit 5 % PCA nicht eingebautes radioaktives

UTP herausgewaschen und die Plättchen mit Äthanol und Äther getrocknet. Die Einbaurrate von markiertem Nucleotid wurde radiochemisch bestimmt und als Maß für die RNA-Syntheseleistung genommen. Unter den von uns verwandten Bedingungen betrug die Zählausbeute ca 55%.

2.8 Untersuchung der RNA-Synthese nach in vivo-Gabe von Dexamethason an Ratten unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Es wurden 2 mg Dexamethason pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal appliziert, 2 Stunden später wurden die Thymi entnommen und nach oben beschriebener Methode Zellkerne präpariert. Bei den Kontrolltieren wurde die entsprechende Menge physiologischer NaCl-Lösung injiziert. Zur Messung der RNA-Synthese wurde vorgegangen wie in 2.7 dargestellt.

2.9 DNA-Bestimmung nach Burton (8)

Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Reaktion, die 1930 von Dische beschrieben wurde: DNA reagiert mit Diphenylamin in Gegenwart von Essigsäure und H_2SO_4 unter Bildung eines blauen Farbkomplexes bei 10-minütiger Erhitzung auf $100^{\circ}C$. Von K.Burton wurde die Methode modifiziert durch Hinzufügen von Acetaldehyd und Inkubation des Testansatzes für 12 Stunden bei $30^{\circ}C$.

Wir stellten unser Reagenz her aus 1,5 g Diphenylamin pro 100 ml konz. Essigsäure und 1,5 ml konz. H_2SO_4 . Vor Gebrauch wurden pro 20 ml Reagenz 0,1 ml Acetaldehyd hinzugefügt. 2 ml der so erhaltenen Lösung inkubierten wir mit 1 ml Kerngemisch in 3 unterschiedlichen Konzentrationen über Nacht bei $30^{\circ}C$. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Zeiss Photometer PM u II bei 600 nm. Die DNA-Konzentration, angegeben in mg/ml ergab sich aus einer Eichkurve, die wir unter Verwendung einer Standard-DNA-Verdünnungsreihe erstellten.

2.10 Eiweißbestimmung nach Lowry (29)

Proteine reagieren mit Folinreagenz (=Ciocalteu-Phenol-

reagenz 1 L $\hat{=}$ 1,22 kg) unter Bildung eines blauen Farbkomplexes, dessen Intensität kolorimetrisch verwertbar ist. Die Ermittlung der Quantität erfolgte unter Zuhilfenahme von Eichkurven. Zur Kontrolle wurden bei jeder Bestimmung Albumin-Standards mitgeführt. Die Extinktion wurde bei 623 nm in einem Zeiss Photometer PM & II gemessen.

2.11 Elektronenoptische Untersuchung

Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkernpräparation wurden elektronenoptische Untersuchungen durchgeführt. Das Sediment gereinigter Thymozyten wurde zur ersten Fixierung 90 min mit Karnowsky-Lösung (2,0% Formaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer) überschichtet, dann 2 x 10 min mit 0,1 m Cacodylatpuffer gespült. Die Entwässerung des Präparates erfolgte in einer Athanol-Verdünnungsreihe ansteigender Konzentration von 50%, 70% und 100% bei einer Einwirkungsdauer von jeweils 2 x 10 min. Das in dieser Weise dehydratisierte Sediment wurde erst 2 x 10 min mit Propylenoxid behandelt, dann 60 min mit Propylenoxid-Epon, schließlich in Epon eingebettet und nach 12 Stunden 2 Tage lang bei 60°C zur Polymerisation gebracht.

2.12 Berechnung der Ergebnisse

Für den statistischen Vergleich zweier Mittelwerte bedienten wir uns der T-Verteilung nach Student. Zunächst wird nach Berechnung des Mittelwertes $\bar{M}$ einer Versuchsreihe die mittlere quadratische Abweichung des Einzelwertes bestimmt (Standardabweichung)

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n - 1}}$$

X=Abweichung vom $\bar{M}$

n= Anzahl der Versuche

Die Standardabweichung des Mittelwertes $\bar{M}$ aus n Messungen ist dann:

$$\sigma_{\bar{M}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Nun wird die Standardabweichung der Differenz D zweier Mittelwerte $\bar{M}_1$ und $\bar{M}_2$ errechnet:

$$\sigma_D = \sqrt{\sigma_{M_1}^2 + \sigma_{M_2}^2}$$

Der t-Wert wird dann nach folgender Gleichung ermittelt:

$$t = \frac{D}{\sigma_D}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade m berechnet sich folgendermaßen:

$$m = n_1 + n_2 - 2$$

Aus einer Signifikanztafel wird der zugehörige P-Wert ermittelt. Signifikante Unterschiede bestehen bei $P \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Elektronenoptische Untersuchung

Bei den Bestimmungen der RNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne ist es erforderlich, daß diese frei von Zytoplasmaanteilen sind. Insbesondere die Kontamination der Präparate mit Mitochondrien (Polymeraseaktivität) kann einen Einfluß auf die Versuchsergebnisse ausüben.

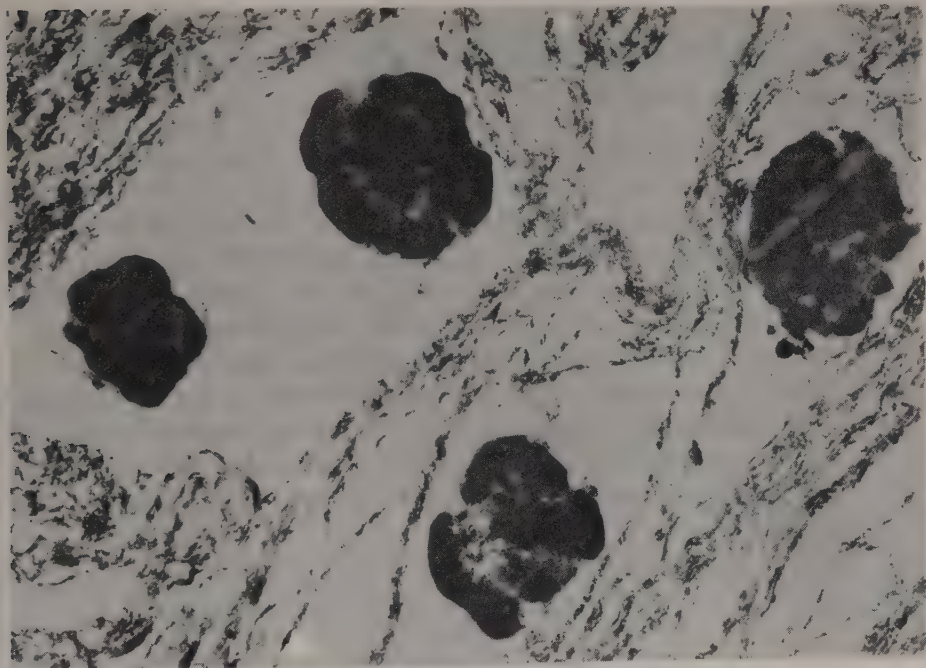


Abb. 3 Elektronenoptisches Photo eines gereinigten Kernsedimentes

Deshalb wurden, um die Reinheit unserer Kernpräparate unter Kontrolle zu stellen, nach 2.3 gewonnene, gereinigte Thymuszellkernsedimente phasenkontrastmikroskopisch und in Einzelfällen elektronenoptisch untersucht. In Abb.3 wird ein elektronenoptisches Bild gezeigt, aus dem ersichtlich ist, daß die Zellkernpräparation frei von grober zytoplasmatischer Kontamination und insbesondere frei von Mitochondrien ist. Es ist damit anzunehmen, daß unsere Präparation den oben genannten Voraussetzungen entspricht.

3.2 Zeitkinetik der ^3H -UTP-Inkorporation durch isolierte Thymozytenkerne

Um die Abhängigkeit der rRNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne von der Inkubationsdauer zu untersuchen, wurden Testansätze von Kernsedimenten wie in 2.7 beschrieben 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min lang inkubiert. Wie aus Abb.4 ersichtlich, zeigte sich, daß der Einbau von ^3H -UTP nach 25 min mit 11 000 dpm/mg DNA ein Maximum erreichte, um anschließend wieder abzufallen. Die Inkubationsdauer liegt somit nach 10 min Inkubationsdauer in einem Bereich des steilen Anstieges und damit in einem Zeitintervall, in dem unterschiedliche rRNA-Asen Aktivitäten nur zu einem geringen Teil die gewonnenen Einbauwerte beeinflussen können.

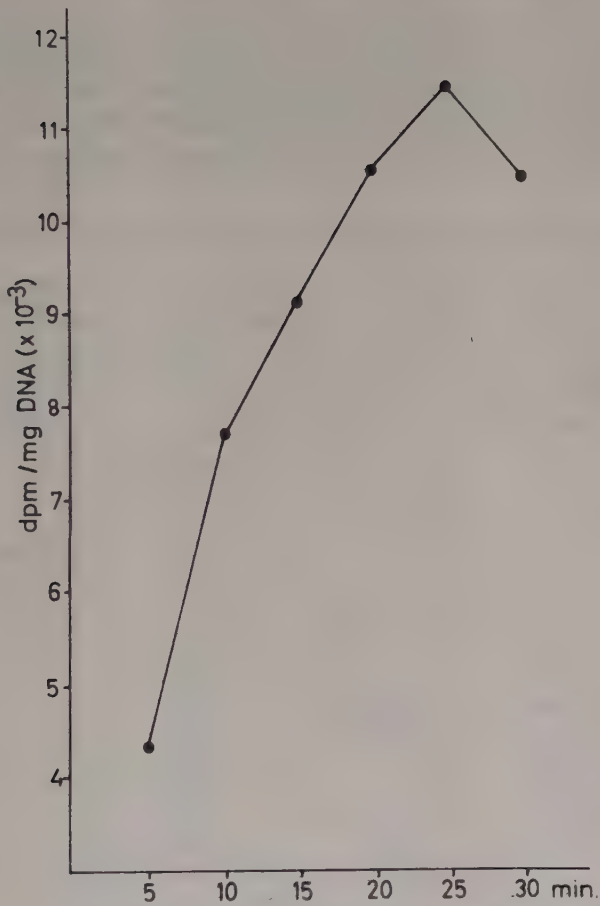


Abb.4 Zeitkinetik der DNA-Polymeraseaktivität isolierter Thymozytenkerne. Bei unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigt sich eine maximale Inkorporation von ^3H -UTP bei einer Inkubationsdauer von 25 min.

3.3 Die rRNA-Syntheseleistung gereinigter Thymozytenkerne während der Rattenentwicklung

Die unter den o.g. Bedingungen ermittelten Ergebnisse der rRNA-Synthese wurden in Abb.5 graphisch dargestellt. Zur Veranschaulichung der erheblichen individuellen Streubreite wurden die einzelnen Meßergebnisse ebenfalls aufgetragen.

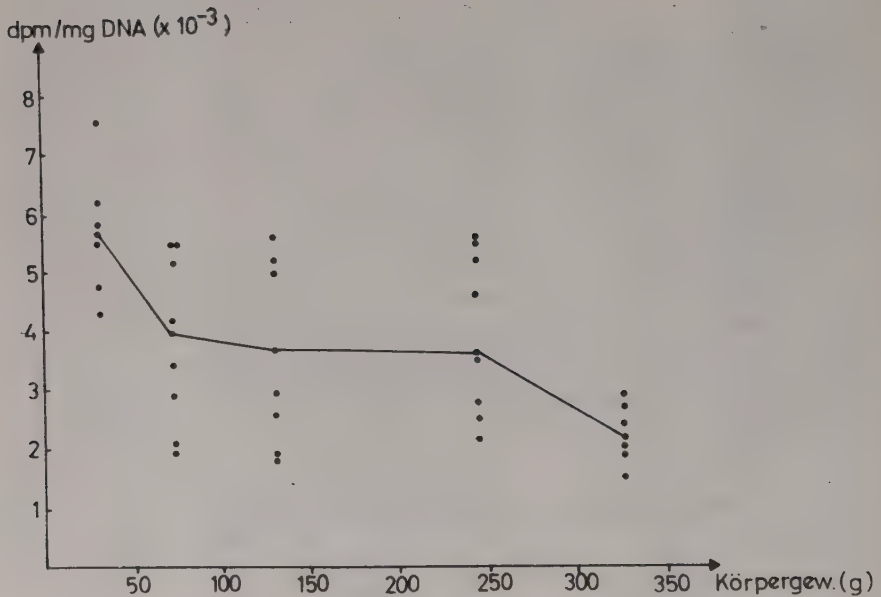


Abb.5 Die rRNA-Syntheseleistung im Verlauf der Rattenentwicklung

Nach einem Maximum der RNA-Syntheseleistung bei Jungtieren in der Gewichtsklasse von 12 - 50 g fällt die RNA-synthetisierende Kapazität des Thymozytenzellkernes im weiteren Entwicklungsverlauf zunächst steil ab, bleibt dann während eines Entwicklungszeitraumes (60 - 260 g Körpergewicht, nahezu konstant, um dann bei älteren Tieren erneut abzufallen.

3.4 Bindungskapazität von Thymuscytosol für ^3H -Dexamethason

Die spezifische Bindungskapazität von Cytosol bei Tieren verschiedener Entwicklungsphasen (unter standardisierten Ernährungsbedingungen, durch Körpergewicht fixiert) steigt während der Rattenentwicklung bis zu einem Körpergewicht von 125g steil an und bleibt bis zu einem Tiergewicht von 160 g weitgehend konstant.

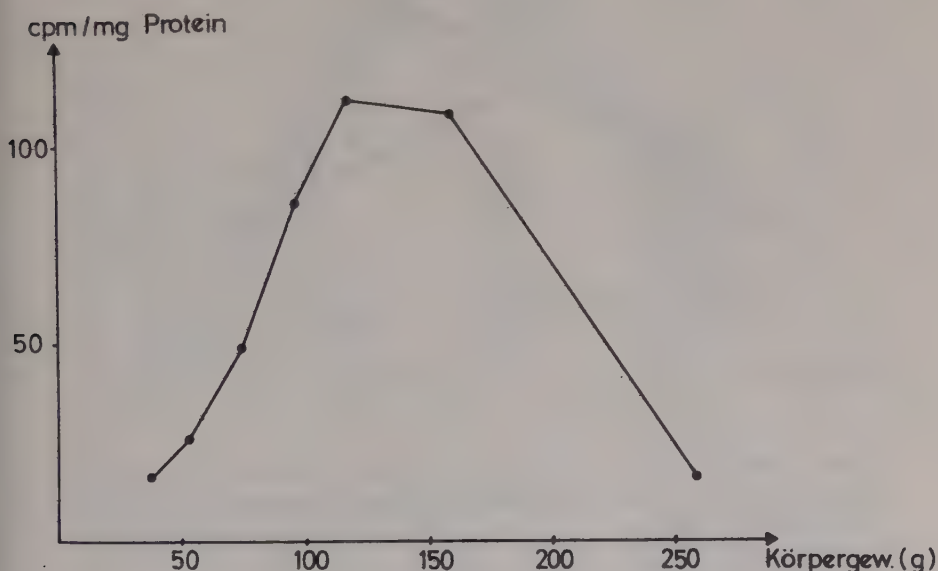


Abb.6 Dexamethasonbindungskurve im Verlauf der Rattenentwicklung

Bei Tieren mit größerem Körpergewicht ist dann eine stärkere Abnahme der Hormonbindungskapazität zu verzeichnen. Wie in Abb.5 und 6 zum Ausdruck kommt, besteht zu der RNA-Synthesekapazität insofern ein unterschiedliches Verhalten, als bei den Transcriptionsuntersuchungen erst bei einem Körpergewicht von über 260 g ein deutlicher Abfall merkbar wird.

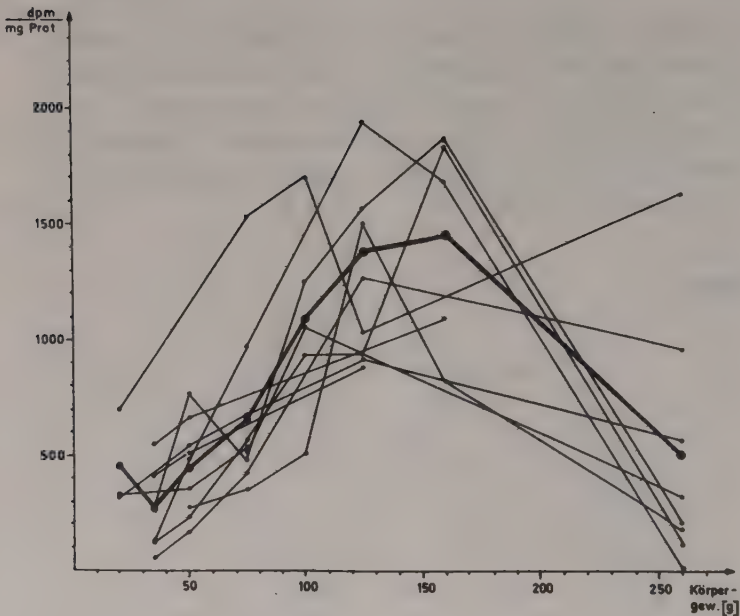


Abb.7 Spezifische Glucocorticosteroidaufnahme der Thymus-cytosoles bei Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit Darstellung von Einzelwerten einer zur Kontrolle durchgeführten zweiten Versuchsserie.

3.5 Hemmbarkeit der RNA-Synthese durch Dexamethason

Die Hemmbarkeit der RNA-Synthese durch Dexamethason nimmt ähnlich der RNA-Syntheseleistung im Verlauf der Rattenentwicklung ab. Bei Tieren über 290 g ist die Hemmbarkeit der Transcriptionsrate durch Dexamethason statistisch nicht signifikant gemindert.

Das Maximum der Hormonbeeinflussbarkeit liegt im Gegensatz zur größten RNA-Syntheserate im normalen Entwicklungsverlauf erst bei Tieren mit einem Körpergewicht von 60 - 85 g.

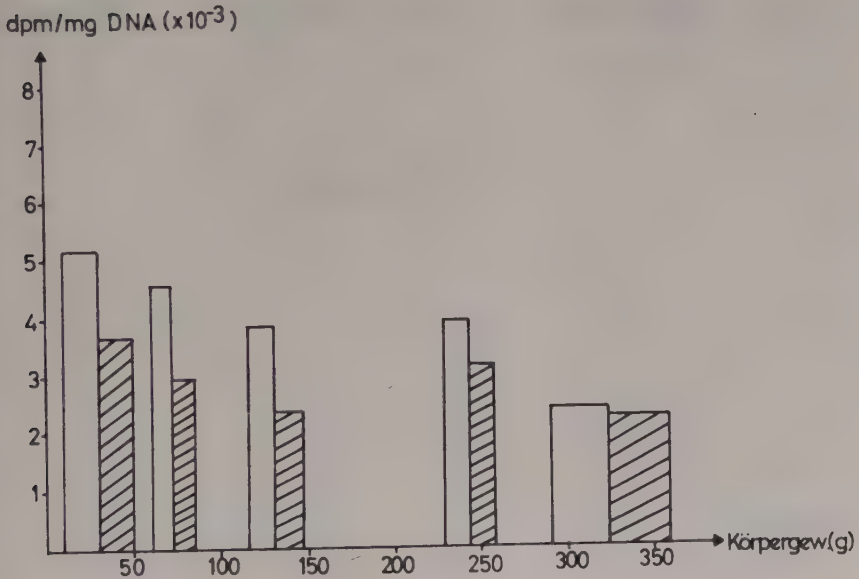


Abb.8 Die Hemmbarkeit der RNA-Synthese, graphische Darstellung der Absolutwerte

Bei den Versuchstieren mittlerer Gewichtsgruppen nimmt die oben beschriebene Dexamethason-Hemmbarkeit der RNA-Syntheseleistung nur langsam ab. Insofern besteht eine Analogie zu der in Abb.6 dargestellten Bindungskapazität im Verlauf normaler Individualentwicklung. Wie bei den Bindungskapazitäts- und RNA-Synthesemessungen finden sich auch bei der Bestimmung der Hormonhemmbarkeit der Transcriptionsrate bei Tieren über 260 g relativ niedrige Werte.

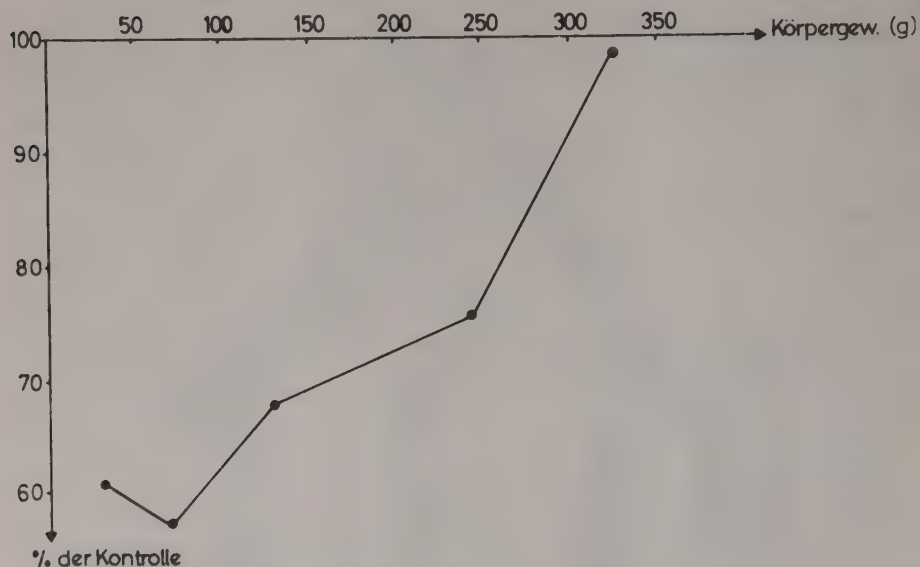


Abb.9 Die Hemmbarkeit der RNA-Synthese, dargestellt anhand einer Hemmkurve

3.6 Zusammenfassende Darstellung von Thymusgewicht, spezifischer Dexamethasonbindungskapazität und RNA-Syntheseleistung im Verlauf der Rattenentwicklung

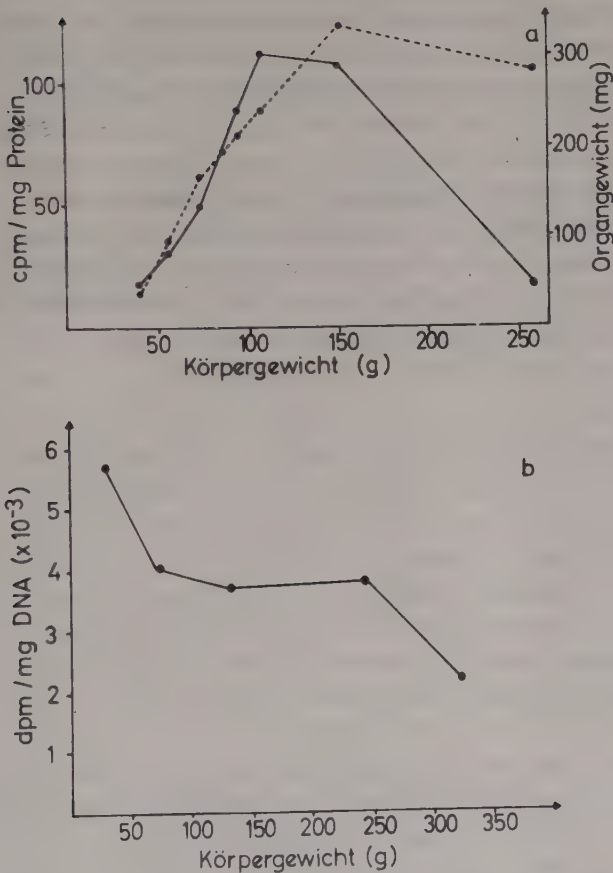


Abb.10 Eine zusammenfassende Darstellung von Thymusgewicht, Hormonbindungskapazität für Dexamethason und RNA-Syntheseleistung im Verlauf normaler Individualentwicklung

Das Organgewicht und die Bindungskapazität zeigen während bestimmter Entwicklungsphasen ein nahezu analoges Verhalten: das gemeinsame Minimum liegt bei Jungtieren unter 50 g, bei Tieren über 150 g erhielten wir sowohl für die Organgewichtsentwicklung, als auch für die Hormonaufnahme relativ niedrige Werte.

Während das Organgewicht, dargestellt als Absolutwert, ab einem Körpergewicht von 150 g nur allmählich abfällt, kommt es bei den Bindungskapazitätsmessungen und den Bestimmungen der RNA-Synthese zu einem außerordentlich raschen Abfall. Der Absolutwert der RNA-Polymerasenaktivität isolierter Thymizytenkerne wie auch die in Abb. 8 und 9 dargestellte Hemmbarkeit durch Dexamethason nimmt im Gegensatz zum absoluten Organgewicht bei Analogie zum relativen Organgewicht (Organgewicht in % des Körpergewichts) bei den Tieren über 250 g außerordentlich rasch ab.

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine theoretisch mögliche Korrelation zwischen spezifischer Hormonaufnahme in die Thymuszelle und der RNA-Synthese während der normalen Individualentwicklung von Mammalien zu erstellen. Dabei fanden sich Analogien, aber auch Diskrepanzen zwischen den von uns untersuchten Parametern der Dexamethason-Bindungskapazität, der RNA-Synthese und ihrer hormonellen Beeinflußbarkeit im Verlauf der Rattenentwicklung.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir das synthetische Glucocorticosteroid Dexamethason, das bei starker biologischer Potenz in dem von uns gewählten Erfolgsorgan Thymus nicht metabolisiert wird. Die RNA-Synthesemessungen wurden an isolierten Zellkernen durchgeführt, da in diesem In-Vitro-System eine Beeinflussung durch veränderliche Nucleotid-Poolgrößen ausgeschlossen ist.

Über die Art des Hormontransportes in die Zielzelle ist verhältnismäßig wenig bekannt; insbesondere über die Wechselwirkung zwischen Transcortin und intrazellulären Bindungsproteinen. Es steht jedoch fest, daß die Hormonkonzentration in den sensiblen Organen wesentlich höher als im umgebenden Gewebe ist. Dieses Phänomen ist bedingt durch die Gegenwart von spezifischen Hormonrezeptoren, deren Bindungskapazität in unseren Untersuchungen gemessen wurde. Nach Bildung eines Hormon-Rezeptorkomplexes wird das Hormon in den Zellkern geschleust, in dem es in spezifischer Weise die Transcription und damit spezifisch veränderte Proteinsyntheseraten beeinflusst. Die Hemmung der RNA-Syntheseleistung des Thymozyten durch Steroidhormone ist quantitativ meßbar und kann somit als ein Parameter der hormonellen Beeinflußbarkeit eines Organs betrachtet werden.

Bei jungen Ratten unter 50 g fanden wir eine maximale RNA-Syntheseaktivität, im weiteren Entwicklungsverlauf kam es zu einem Abfall, der sich besonders deutlich bei Tieren von 60 - 85 g und über 290 g manifestierte.

Wir inkubierten bei den in vitro-Messungen 10 min bei 37 °C um unterschiedliche Degradationsaktivität durch RNA-asen möglichst auszuschließen. Wie aus Abb.4 ersichtlich, erhält man bei längerer Inkubationsdauer zwar höhere Einbauraten, muß jedoch unterschiedliche RNA abbauende Enzymaktivitäten bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen.

Die hinlänglich beschriebene Thymusinvolution während der Individualentwicklung kommt auch bei den Messungen der RNA-Syntheseleistung isolierter Thymozytenkerne verschiedenen alter Ratten zum Ausdruck. Wie in Abb.5 graphisch dargestellt, scheint die Thymusinvolution in zwei voneinander getrennten Perioden zu erfolgen. Bei Tieren mittlerer Gewichtsklassen konnten wir nur einen sehr geringen Abfall der RNA-Syntheseleistung verzeichnen.

Die Hemmbarkeit der RNA-Synthese durch Dexamethason verhält sich analog: In Entwicklungsstadien mit reger RNA-Synthese ist die Hemmbarkeit besonders deutlich. Allerdings liegt ihr Maximum erst bei Tieren mit einem Körpergewicht von 60 - 85 g, während die stärkste RNA-Syntheseleistung bereits bei Tieren unter 50 g gemessen werden konnte.

Aus den Hormonbindungskurven ist ersichtlich, daß ein Maximum der spezifischen Hormonaufnahme bei Tieren um 120 g besteht, während die größte RNA-Synthesehemmbarkeit schon bei Jungtieren von 60-85 g zu beobachten ist, also in einer Gewichtsklasse, deren cytoplasmatische Hormonbindende Kapazität noch sehr gering ist. Bei älteren Tieren lassen sich im Gegensatz hierzu die von uns untersuchten Parameter in gute Korrelation bringen. Es kommt zu einem steilen Abfall der Bindungskapazität, gleichzeitig zur Minderung der RNA-Synthese und ihrer Inhibierbarkeit durch Glucocorticosteroide. Die Minderung der spezifischen Hormonaufnahme ebenso wie das absolute Organengewicht im Verlauf der Rattenentwicklung erfolgt allerdings schon zu einem etwas früheren Zeitpunkt als die Abnahme der RNA-Polymeraseaktivität und ihrer Beeinflussbarkeit durch Dexamethason.

Die oben dargelegte Diskrepanz zwischen hoher RNA-Synthesehemmbarkeit und geringer cytoplasmatischer Steroidhormonbindungskapazität weist auf die Möglichkeit hin, daß zumindest bei Jungtieren ein primär intranucleär lokalisiertes Rezeptorprotein existiert - wie schon in der Literatur beschrieben (1,2,37,49,53), dessen Aktivität von unseren, an gereinigten Thymozytenkernen durchgeführten Untersuchungen erfasst wird.

Weiterhin zeigt der Verlauf unserer Hemmkurve, daß durch die Applikation von Glucocorticosteroiden zu frühen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung die primären Regelmechanismen des Thymus eingeschränkt werden, und zwar in weit stärkerem Ausmaß, als dies in späteren Entwicklungsstadien der Fall ist. Es muß jedoch einschränkend gesagt werden, daß in diesen von uns durchgeführten Untersuchungen die Wirkung von anderen Steroidhormonen auf die Thymuszelle nicht berücksichtigt wurde. Da aus methodischen Gründen eine Adrenalektomie nicht erfolgte, ist die Beeinflussung der beschriebenen Versuchsergebnisse durch den endogenen Hormonspiegel zu berücksichtigen. Zur weiteren Klärung wäre es notwendig, Bezugswerte zu ermitteln, indem die spezifische Hormonaufnahme für Östrogene und Androgene, sowie ihre Beeinflussung der RNA-Synthese in analoger Weise wie in dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf der postnatalen Mattenentwicklung wurde die spezifische Dex methason-Bindungskapazität im Zytoplasma isolierter Thymozyten bestimmt und in Parallelversuchen die RNA-Syntheseleistung gereinigter Zellkerne gemessen. Weiterhin ermittelten wir die durch Dexamethason induzierte Hemmbarkeit der RNA-Syntheserate.

Dabei zeigte sich, daß sowohl die RNA-Synthese ($5,7 \cdot 10^3$ dpm $^3\text{H-Ump}$ inkorporiert in RNA/mg DNA), als auch ihre hormonelle Beeinflussbarkeit (61,3% der kontrollen) bei Jungtieren maximale Werte erreichte, um im weiteren Entwicklungsverlauf abzunehmen. Bei Tieren über 290 g war die Hemmbarkeit der RNA-Synthese statistisch nicht signifikant.

Die Bindungskapazität der Thymuscytosol für Dexamethason zeigte maximale Werte (112 cpm/mg Protein) bei Tieren mit einem Körpergewicht von 125 g, während bei Ratten über 160 g und unter 50 g nur eine geringe spezifische Hormonaufnahme (jeweils um 20 cpm/mg Protein) erfolgte. Die postnatale Entwicklung des absoluten Organgewichts zeigte einen den Hormon-Bindungskurven entsprechenden Verlauf.

Literaturverzeichnis

1. Abraham, A.D., Sekeris, C.E.: Corticosteroid binding macromolecules in the nucleus and cytosol of rat thymus cells, *Biochem. Biophys. Acta* 297, 142-154 (1973)
2. Ambellam, E.: Glucocorticoid tight binding in rat liver and thymus particles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 57, 520-525 (1974)
3. Barker, K.L., Warren, J.C.: Template activity of uterine chromatin; control by estradiol. *Proc. nat. acad. sci (wash)* 56 (1966) 1298
4. Baulieu, E.E., Jammet, P.R., Milgrom, E.: Measurement of steroid binding protein. *Acta endocr. (Kbh) suppl.* 142, 104 (1970)
5. Beato, M., Schmid, W., Braendle, W., Bieseweg, D., Sekeris, C.E.: Binding of ^3H -cortisol to macromolecular components of rat liver cells and its relation to the mechanism of action of corticosteroids. In: *Advances in biosciences*, Vol. 7 (Pergamon press, Vieweg: Oxford, Braunschweig 1974) 349
6. Beato, M., Seifart, K.H., Sekeris, C.E.: The effect of cortisol on the binding of actinomycin to and on the template activity of isolated rat liver chromatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 132 (1970) 272
7. Beier, H.M.: Uteroglobulin, a hormon-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochem. Biophys. Acta (Amst.)* 160 (1968) 289
8. Burton, K.: A study on conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 315-323 (1956)
9. Burton, A.F., Storr, J.M., Dunn, W.L.: Cytolytic action of corticosteroids on thymus and lymphoma cells in vitro. *Can. J. Biochem.* 45, 289-297 (1967)
10. Chauveau, J., Moule, Y., Rouille, C.: *Exptl. Cell Res.* II, 317 (1956)

11. Clever, U., Karlson, P.: Induktion von "Puff"-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tetans durch Ecdyson. *Exptl. Cell. Res.* 20, (1960) 623
12. Feigelson, R., Feigelson, M.: Studies on the mechanism of cortisone action. In: Litwach, G., Kritchevsky, D. (ed): *Action of hormones on molecular processes* (Wiley: New York 1964) 218
13. Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D., Notides, A.: Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with uterus. *Rec. Progr. Hormone Res.* 24 (1968) 45
14. Greengard, C., Lempert, N.: Effect of tumor-bearing phenylhydrazine and cortisone on thymidine kinase and other enzymes in rat hematopoietic organs. *Enzyme* 14, 229-237 (1972/1973)
15. Greengard, C., Machovich, R.: Hydrocortisone regulation of thymidine kinase in thymusinvolution and hematopoietic tissue. *Biochem. Biophys. Acta* 286, 382-388 (1972)
16. Hamilton, T.H.: Control by estrogen of genetic transcription and translation. *Science* 161 (1968) 649
17. Jakob, F., Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol.* 3 (1961) 318
18. Jensen, E.V., Somre, E.R.: Estrogens and progestins. In: Litwach, G. (ed): *Biochemical action of hormones*, Vol. II (Academic Press: New York-London 1972) 245
19. Jensen, E.V., Suzuki, I., Kawaxhima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., De Sombre, E.R.: A two step mechanism for the interaction of estradiol with the rat uterus. *Proc. nat. Acad. Sci (Wash)* 59 (1968) 632
20. Karlson, P.: Biochemische Wirkungsweise der Hormone. *Dtsch. med. Wschr.* 86 (1961) 668
21. Karlson, P., Sekeris, C.E.: Biochemical mechanisms of hormone action. *Acta endocr. (Kbh)* 53 (1966) 505
22. Kidson, C.: Cortisol in the regulation of RNA and protein synthesis. *Nature* 213 779-782 (1967)

23. Kochakian, C.D.: Mechanism of anabolic action of androgens in: Karlson, P. (ed): Mechanism of hormone action (Thieme, Stuttgart 1965)
24. Lang, N., Herrlich, P., Sekeris, C.E.: On the mechanism of hormone action. VII Induction by cortisol of a messenger RNA coding for tyrosine alpha-ketoglutarate transaminase in an in vitro system. *Acta endocr. (Kbh)* 57 (1968) 33
25. Lang, N., Sekeris, C.E.: Zum Wirkungsmechanismus der Hormone III. Einfluß von Cortisol auf den Ribonucleinsäure- und Proteinstoffwechsel in der Rattenleber. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 339 (1964) 238
26. Liao, S., Fang, S.: Receptor proteins for androgens and the mode of action of androgens on gene transcription in ventral prostate. *Vitam. and Horm.* 27 (1969) 17
27. Liao, S., Lin, A.H.: Prostatic nuclear chromatin: an effect of testosterone on the synthesis of ribonucleic acid rich in cytidyl (3'5') guanosine. *Proc. nat. Acad. Sci (wash)* 57 (1967) 379
28. Litwack, G., Kritchevsky, D.: Action of hormones on molecular processes (Wiley: New York 1964)
29. Lowry, C.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
30. Makman, M.W., Dvorkin, B., White, A.: Alterations in protein and nucleic acid metabolism of thymocytes produced by adrenal steroids in vitro. *J. Biol. Chem.* 241 1646-1648 (1966)
31. Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E.E.: Acidophilic activation of steroid hormone receptors. *Biochemistry* 12 (1973) 5198-5205
32. Moscona, A.A., Moscona, M., Saenz, N.: Enzyme induction in embryonic retina: The role of transcription and translation. *Proc. nat. Acad. Sci. (wash)* 61 (1968) 160
33. Noteboom, W.D., Gorski, J.: An early effect of estrogen on protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci (wash)* 50 (1963)

34. Mueller, G.: The role of RNA and protein synthesis in estrogen action. In Karlson, P. (ed) Mechanisms of hormone action (Thieme, Stuttgart 1965) 228
35. O'Malley, B.: Hormone regulation of nucleic acid and protein synthesis. Trans. N.Y. Acad. Sci. 31 (1965) 228
36. O'Malley, B., Rosenfeld, G.C., Comstock, J.P., Means, A.R.: Steroid hormone induction of a specific translatable messenger RNA. Nature new Biol. 247 (1972) 45
37. Schaumburg, B.P.: Studies of the glucocorticoid binding protein from thymocytes. I. localisation in the cell and some properties of the protein. Biochem. Biophys. Acta 214 (1970) 520-532
38. Schütz, G., Beato, M., Feigelson, P.: Messenger RNA for tryptophan oxygenase: its translation in vitro and control by glucocorticoid hormones. Proc. nat. acad. Sci. (wash) submitted.
39. Schwick, H.G.: Chemisch- entwicklungsphysiologische Beziehungen von Uterus zu Blastocyste des Kaninchens (Crypt. cuniculus). 'Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 155 (1965) 283
40. Segal, S., Davidson, C.W., Wada, K.: Role of RNA in the regulatory action of estrogen. Proc. nat. acad. Sci. (wash) 51 (1965) 782
41. Sekeris, C.E.: Wirkung der Hormone auf den Zellkern. In 18. Colloquium der Gesellsch. f. physiol. Chemie (Springer: Berlin-Heidelberg-New York 1967) 126
42. Sekeris, C.E.: Increased template activity of chromatin: a first step for the expression of hormone action. In Gual, C. (ed): Progress in Endocrinology (Excerpta Medica Foundation: Amsterdam 1969) 7
43. Tata, I.R.: Hormones and the synthesis and utilisation of ribonucleic acids. Rec. Progr. Hormone Res. 5 (1966) 191
44. Talwar, G.P., Segal, S.I., Evans, A., Davidson, C.W.: The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for de-repression of RNA-synthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (wash) 52 (1964) 1049

45. Pomkins, G.M., D...Martin jr.: Hormones and gene expression
Ann. Rev. Genet. 4 (1970) 91
46. Turnell, R.W., Clarke, L.H., Burton, A.F.: Studies on the
mechanism of glucocorticosteroid induced lymphocytolysis.
Cancer res. 33 (1973) 203-212
47. Turnel, W.R., Kaiser, N., Milholland, J.R., Rosen, F.R.:
Glucocorticoid receptors in rat thymocytes. Interaction
with the antiglucocorticoid cortexolone and mechanism
of its action. J. Biol. Chem. 249, (1974) 1133-1138
48. Unhjem, O. in: Hubinont, Leroy, F.O., Galand, F.P. (ed):
Basic actions of sex steroids on target organs. (Karger:
Basel 1971) 112, 227
49. Van der Meulen, N., Abraham, A.D., Sekeris, C.E.: role of
the nuclear cortisol binding protein in the control of
transcription of thymocyte nuclei by cortisol. F.E.B.S.
Letters 25 (1972) 116
50. Wada, H.: Role of RNA in the regulatory action of estro-
gen. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 51 (1965) 782
51. Whifield, J.F., Perris, A.D., Yondale, T.: Destruction of
nuclear morphology of thymic lymphocytes by the corti-
costeroid cortisol. Exptl. Cell. Res. 52 (1968) 349-362
52. Wicks, M.D., Kenney, F.T.: RNA synthesis in rat seminal
vesicles: stimulation by testosterone. Science 144 (1969)
1346
53. Wira, Ch., Munck, A.: Specific glucocorticoid receptors in
thymus cells. J. Biol. Chem. 245 (1970) 3436-3438
54. Yu, Fu-li und Feigelson, P.: A proposed model for the glu-
cocorticoidal regulation of rat hepatic ribosomal RNA
synthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 53 (1973) 754-760

Lebenslauf

Ich bin am 7.9.46 in Marburg geboren als Sohn des Dr. med. Immo Schmiedeberg und seiner Ehefrau Anneliese Schmiedeberg geb. Röhle. Seit Ostern 1953 besuchte ich die Schloßbergschule in Marburg, drei Jahre später übersiedelten wir nach Bad Hersfeld, wo ich ein Jahr lang die Lingg-Schule besuchte; anschließend absolvierte ich die Aufnahmeprüfung des altsprachlichen Zweiges der Alten Klosterschule in Bad Hersfeld, an der ich neun Jahre später, am 24.2.1966 mein Abitur bestand. Am 1.10.1966 begann ich mein Medizinstudium in Wien; das erste Rigorosum bestand ich am 6.10.1970. Anschließend verbrachte ich noch mein erstes klinisches Semester in Wien, um dann im Februar 1971 nach Marburg überzuwechseln, wo ich am 15.1.1974 das medizinische Staatsexamen bestand. Nach Absolvierung der Medizinalassistentenzeit an den Marburger Universitätskliniken, erhielt ich am 30.4.1975 die Approbation als Arzt und bin seitdem an der geburtshilflich-gynäkologischen Station des Diakonieverkrankenhauses in Wehrda beschäftigt.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Leitung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof.Dr.med.F.Linneweh meinen Dank aussprechen.

Für ihre Anregungen und Unterstützungen danke ich Herrrn Prof. Dr.med.W.Hort, Herrn Dr.med.K.Lipp, Herrn Dr.med. Van der Meulen.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

In Wien:

Artner, Asperger, Auerwald, Böck, Deutsch, Fuchsig, Gisel,
Hayek, Holzner, Husslein, Kaiser, Katochwil, Krause,
Langer, Mainx, Novotny, Schedling, Schubert, Seelich,
Slezak, Stockinger, Tappeiner

In Marburg:

Arndt, Barthelmai, Berendes, Bode, Bommer, Busch, Daume,
Dittrich, Dölle, Eißner, Engelhardt, Exner, Friederich,
Ganz, Gerdes, Graul, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Hein,
Hess, Hildebrand, Hort, Jakob, Janke, Joseph, Kaffarnik,
Klaus, Klein, Knauff, Koch, Koransky, Korb, Kuni, Leh-
mann, Linneweh, Lütcke, Mann, Maroske, Martini, Mannheim,
Pots, Riecken, Rodeck, Rohen, Rupec, Schaumlöffel, Schleyer,
Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Seifart, Siegert,
Solcher, Straub, Strohmeier, Struck, Stutte, Thoenes,
Willenbockel.

